

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **07184638 A**

(43) Date of publication of application: **25 . 07 . 95**

(51) Int. Cl.

C12N 1/16
C12G 3/02
C12G 3/12
// C12N 1/00
(C12N 1/16 , C12R 1:865)

(21) Application number: **05348889**

(71) Applicant: **TAKARA SHUZO CO LTD**

(22) Date of filing: **28 . 12 . 93**

(72) Inventor:
INOUE TAKAYUKI
KUROSE NAOTAKA
UCHIDA MASAHIRO
MIYABE TOSHINORI

(54) **NEW YEAST AND ITS USE**

(57) Abstract

PURPOSE: To provide a method for stably mass-producing a Japanese rice wine enriched in fermented flavor from low-polished rice at low cost in a short period by using a new yeast having a high productivity of isoamyl acetate.

Saccharomyces cerevisiae, resistive to miconazole and/or econazole and capable of producing a large amount of isoamyl acetate component and a method for producing Japanese rice wine by using this yeast are provided. A method for selecting a new yeast, capable of selecting a miconazoleand/or econazole-resistant *Saccharomyces cerevisiae* from a group of yeast cells is also provided.

COPYRIGHT: (C)1995 JPO

CONSTITUTION: A new yeast belonging to

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-184638

(43) 公開日 平成7年(1995)7月25日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 1/16	G	8828-4B		
C 1 2 G 3/02	1 1 9 G			
3/12				
// C 1 2 N 1/00	T	8828-4B		
(C 1 2 N 1/16				

審査請求 未請求 請求項の数 3 F D (全 7 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平5-348889

(71) 出願人 591038141

實酒造株式会社

(22) 出願日 平成5年(1993)12月28日

京都府京都市伏見区竹中町609番地

(72) 発明者 井上 隆之

滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号 實酒造株式会社中央研究所内

(72) 発明者 黒瀬 直孝

滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号 實酒造株式会社中央研究所内

(72) 発明者 内田 正裕

滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号 實酒造株式会社中央研究所内

(74) 代理人 弁理士 中本 宏 (外2名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規酵母及びその用途

(57) 【要約】

【目的】 酢酸イソアミルの生成能の高い新規酵母菌を提供し、更に該酵母を用いて低精白米から、安定にかつ大量に、吟醸香の豊かな酒類を製造する方法を提供する。

【構成】 酢酸イソアミル成分を多量生産するミコナゾール及び／又はエコナゾール耐性のサッカロミセス・セレピシエに属する新規酵母。該酵母を用いる酒類の製造方法。酵母細胞の母集団から、ミコナゾール及び／又はエコナゾールに対して耐性を示すサッカロミセス・セレピシエを選択する新規酵母の選択方法。

【効果】 普通酒仕込あるいは低価格米による焼酎仕込において酢酸イソアミルを主とする香気エステルの豊かな、芳香性に富んだ清酒、焼酎及びその他の酒類の製造が、低コストで、しかも短期間で安定して行うことが可能となる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 酢酸イソアミル成分を多量生産するミコナゾール及び／又はエコナゾール耐性のサッカロミセス・セレビシエに属する新規酵母。

【請求項2】 請求項1に記載のサッカロミセス・セレビシエを用いることを特徴とする酒類の製造方法。

【請求項3】 酵母細胞の母集団からミコナゾール及び／又はエコナゾールに対して耐性を示すサッカロミセス・セレビシエを選択することを特徴とする請求項1に記載の新規酵母の選択方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、ミコナゾール及び／又はエコナゾールに耐性を示す酵母及び該酵母を用いた香気の豊かな酒類の製造方法に関する。更に詳細には、本発明は、香気成分のうち酢酸イソアミルを多く生成する酵母を、多くの酵母細胞の中から容易に選択する方法に関し、更には選択した酵母を用いて、香気の豊かな酒類を製造する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】 酒類、特に清酒の製造において、フルーティな吟醸香成分の含量の高い清酒を製造するには、低精白米を使用し、15℃前後で発酵させる普通酒仕込では困難である。従来、吟醸香に富んだ清酒を得るためには高度精白米を使用し、低温発酵を行ってきた。しかしながら、この方法では時間とコストがかかる。現状では、低精白米の加圧蒸しやリパーゼ処理等が行われるようになったが、低精白米の普通酒仕込から吟醸香に富んだ清酒を製造することは、困難であることより、酵母の育種という観点からの技術開発に依存する方向が進められ、これまでに、5'、5'、5'ートリフルオロ-D、L-ロイシン耐性を用いる方法（特開昭62-6669号）、4-アザ-D L-ロイシン耐性を用いる方法（特開平1-257423号）、及び固形色素平板培地上で異なる色調を示す株を選択する方法（特開平2-13368号）が公開されている。しかしながら、吟醸香を構成する成分を、その他の成分と官能的にバランスを保った形で高生成する酵母は少なく、そういった酵母の育種が待たれていた。また、焼酎の製造においても、香りの良い焼酎を製造するためには、同様の問題点を有していた。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】 香気成分の豊かな吟醸酒の場合、原料コストが高く、また製造日数も長くなることから、安定に大量の吟醸酒を製造することは困難であった。また、低精白米を用いる普通酒仕込では、吟醸香に富んだ清酒を製造することは更に困難であった。

【0004】 本発明の目的は、前記の従来技術の問題点を解決すべく、普通酒仕込で吟醸香の高い、あるいは新規な吟醸香を有する清酒を製造することにある、そのた

めの特に酢酸イソアミルの生成能の高い新規酵母菌を提供すること、及び該酵母を用いて低精白米から、安定にかつ大量に、吟醸香の豊かな酒類を製造する方法を提供することにある。

【0005】

【課題を解決するための手段】 本発明を概説すれば、本発明の第1の発明は、酢酸イソアミル成分を多量生産するミコナゾール及び／又はエコナゾール耐性のサッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) に属する新規酵母に関し、第2の発明は、本発明の第1の発明の当該酵母を用いることを特徴とする香気成分の豊かな酒類の製造方法に関し、第3の発明は、酵母細胞の母集団からミコナゾール及び／又はエコナゾールに対して耐性を示すサッカロミセス・セレビシエを選択することを特徴とする本発明の第1の発明の新規酵母の選択方法に関する。

【0006】 ミコナゾール、エコナゾールは酵母細胞膜の構築や機能に重要な役割を果たすリン脂質、中でも不飽和脂肪酸残基に特異的に作用し、膜障害を引き起こすことが知られている〔永井 進編、酵母研究における方法論—基礎と応用、第234頁、1982年1月20日、(株)学会出版センター発行〕。本発明者らは、このようなミコナゾール、エコナゾールの膜リン脂質親和性に着目し、ミコナゾール及び／又はエコナゾールに対して耐性を示す酵母は、細胞膜のリン脂質の不飽和度を含めて構造が変化し、その結果、酢酸エステル生成量や香気成分の膜透過性が変化するのではないかと考えた。

【0007】 本発明者らは、清酒用泡なし酵母、日本醸造協会901号（以下、K 901と略述する）株の変異処理株を、ミコナゾール及び／又はエコナゾールを含む最少培地で生育させ、当該培地で生育できる株を分離し、清酒小仕込試験を重ねて清酒の官能試験、機器分析により、酢酸イソアミルの高生産株を選別できることを見出し、本発明を完成した。

【0008】 本発明における酢酸イソアミル高生産株とは、リンゴ酸及び／又はクエン酸の高生産株をも含むが、生成する酢酸イソアミルの基質であるイソアミルアルコールの生産量は親株と同等であることを特徴としている。

【0009】 選択される酵母細胞の母集団は、変異処理株のほかに野生株、馴養株、交雑株、細胞融合株及びプラスミド等による形質転換株をも含む。

【0010】 ここに得られるミコナゾール及び／又はエコナゾール耐性株は、清酒酵母、焼酎酵母、ワイン酵母、ビール酵母、ウイスキー酵母、アルコール酵母、及びパン酵母のいずれでも、酢酸イソアミルを多く生成するので、これらの酵母を用いて清酒、焼酎、ワイン、ビール、ウイスキー等の酒類、又はパン等の食品を製造すれば、香気の豊かな製品を製造することができ、更

に、これらの酵母を用いて芳香性の香氣液を製造することも可能である。

【0011】清酒、焼酎、ワイン、ビール、ウイスキー、香氣液、パンなどの製造方法は特に限定するものではなく、一般的な方法に従って製造することができる。

【0012】以下にその分離方法の1例を示す。

(酵母の変異処理方法) K-901株の酢酸イソアミル高生産株を取得するために、以下の工程で変異処理を行った。K-901株をYPD液体培地(酵母エキス1w/v%、ホリバフトン2w/v%、グルコース2w/v%) 5mlで30℃にて一夜振とう培養した。遠心分離で菌体を集菌した後、0.2Mリン酸バッファー(pH 8.0)で洗浄した。洗浄菌体を4.6mlの0.2Mリン酸バッファー(pH 8.0)で懸濁し、40w/v%グルコース溶液を0.25ml添加してよくかくはんした後、0.15mlの3w/v%エチルメタンスルホネート(EMS)水溶液を添加し、30℃にて1時間穏やかに振とうした。その0.2mlを9.8mlの6w*

* /v%チオ硫酸ナトリウム溶液に加えて、室温で10～15分維持し、そのうちの0.2mlを19.8mlの滅菌水に添加し、0.1mlずつ、5μg/mlのミコナゾール及び/又はエコナゾールを含有するSD培地

【イーストニトロゲンベース(アミノ酸不含) 0.67w/v%、グルコース2w/v%】の平板寒天培地10枚に塗布し、30℃で3日間培養した。ミコナゾールを含む選択培地で生育してきた株(MIC17)、及びエコナゾールを含む選択培地で生育してきた株(ECO11、ECO22)をミコナゾール及び/又はエコナゾール耐性株として選択した。

【0013】(酢酸イソアミル生成の高い菌株の選択方法) ミコナゾール及び/又はエコナゾール耐性の変異株(MIC17、ECO11、ECO22)について、表1に示す仕込配合で清酒の小仕込試験を行った。

【0014】

【表1】

表 1 仕 込 配 合

	初 添	仲 添	留 添	合 計
総 米 (g)	33	60	107	200
掛 米 (g)	21	47	91	159
麴 米 (g)	12	13	16	41
乳 酸 (ml)	0.23			0.23
汲 水 (ml)	51	85	168	304
酵 母 (ml)	5			5

【0015】掛米は精米歩合75%(w/w)のα米〔セブンライス工業(株)製〕を使用した。麴米は、精米歩合72%(w/w)の白米を用いて製造した。酵母は5ml中に 1×10^6 個含むものを添加した。発酵温度は15℃一定で行った。留後13日目の醪のろ液について、ガスクロマトグラフィーで酢酸イソアミルの定量を行った結果、いずれのミコナゾール及び/又はエコナゾール耐性変異株も親株(K-901株)の1.2～1.8倍の酢酸イソアミルを生成することを認めた。以上の酢酸イソアミル高生産という形質は、当該変異株がK-901株とは異なる新規酵母菌であることを示すものである。

【0016】上記のように、本発明による菌株〔変異株: MIC17、ECO11、ECO22〕は、K-901株の変異株であるが、その菌学的性質を以下に示す。

(菌学的性質)

グルコース (+)
スクロース (+)
ラクトース (-)
ソフィノース (+)

※ 1. 形態学的性質

YPD培地で30℃、2日間培養した後、顕微鏡で観察した。

a) 形: 卵円形

b) 大きさ: 長さ4.7～7.9μm、幅3.8～5.5μm

2. 胞子形成: 有り

胞子形成用培地(酢酸カリウム2w/v%、グルコース0.05w/v%、寒天2w/v%)で30℃、5日間培養し、顕微鏡で観察した。

3. 増殖の形態: 出芽

4. 生化学的観察

a) 糖の発酵性

ウィッカーハムの炭素化合物同化試験用培地(ディフコ社製)をダーラム管入り試験管に分注して、当該3菌株を接種し、30℃で7日間培養して、その炭酸ガス発生の有無を観察した。

ガラクトース (+)

マルトース (+)

メリビオース (-)

b) 糖の資化性

ウィッカーハムの炭素化合物同化試験用培地（ディフコ*

グルコース (+)

スクロース (+)

ラクトース (-)

c) 硝酸塩の同化性: (-)

硝酸塩は硝酸カリウムとし、ウィッカーハムの炭素化合物同化試験用培地（ディフコ社製）を用いて、オキザノグラフ法により生育を観察した。

d) TTC染色性: 赤

e) β -アラニン培地、35℃での生育: (+)

5. 高泡の形成

清酒の小仕込を行った結果、いずれの変異株も高泡の形成は観察されなかった。

以上、形態学的、生化学的結果は、本発明酵母3菌株がサッカロミセス・セレビシエに属する酵母菌であることを示すものである。また、清酒の小仕込試験において、高泡の形成が認められないことから、当該3菌株はK-901株の変異株であることを示すものである。

【0017】かくして、本発明により、K-901株を20
変異させた後、ミコナゾール及び／又はエコナゾールを含む培地で選択することによって、酢酸イソアミルを高生成する、普通酒仕込に使用可能な香氣高生成酵母が提供された。代表的な菌株であるMIC17株及びECO11株は、それぞれ *Saccharomyces cerevisiae* MIC17、*Saccharomyces cerevisiae* ECO11と表示 ※

*社製）を用いて、オキザノグラフ法により、30℃、14日後の生育を観察した。

ガラクトース (+)

マルトース (+)

※し、工業技術院生命工学工業技術研究所に、FERM P-14024、及びFERM P-14015として寄託してある。本発明の清酒、焼酎及びその他の酒類の製造方法は、これらの酵母菌株を用いることを特徴とし、醸造方法は特に限定するものではない。

【0018】

【実施例】次に、本発明菌を用いた酒類製造の具体例を挙げて、本発明を更に具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されない。

【0019】実施例1

ミコナゾール及び／又はエコナゾール耐性変異株3株について、表1に示す仕込配合で清酒の製造を行った。掛米は精米歩合75% (w/w) の α 米〔セブンライス工業（株）製〕を使用した。麴は、精米歩合72% (w/w) の白米を用いて製造した。酵母は5ml中に 1×10^8 個含むものを添加した。発酵温度は15℃一定で行った。対照株として親株のK-901株を加えた。上槽液の分析結果を表2に示す。

【0020】

【表2】

表 2 清酒小仕込上槽液分析結果

	対照株	変異株		
	K-901	MIC17	ECO11	ECO22
アルコール(v/v%)	19.3	18.9	19.0	18.8
日本酒度	+5.0	-1.0	+2.5	+1.5
pH	4.25	4.28	4.24	4.38
滴定酸度 (ml)	2.70	2.50	2.75	2.75
アミノ酸度 (ml)	1.65	2.05	1.85	2.05
低沸点香気成分 (ppm)				
アセトアルデヒド	20.0	23.8	28.6	21.0
酢酸エチル	184.3	142.0	142.1	178.0
n-プロパノール	94.1	102.1	106.4	110.9
酢酸イソアミル	9.6	17.2	12.3	17.6
イソブタノール	117.5	176.8	134.5	123.3
カプロン酸エチル	0.5	0.2	0.6	0.5
イソアミルアルコール	253.6	290.6	237.6	245.4
有機酸成分 (ppm)				
クエン酸	92.7	127.6	94.1	110.4
リンゴ酸	337.2	274.1	296.2	196.4
コハク酸	780.1	826.1	874.7	664.0
乳酸	908.0	900.1	865.6	839.5
酢酸	38.6	18.4	69.6	34.6
官能検査 (芳香性)	2.1	1.4	1.8	1.3

【0021】官能検査は3点法（1：良、2：普通、3：悪）で行い、ハネラー10名の平均値で表した

【0022】この結果、MIC17株とECO22株は、清酒の香気成分の中で、特に吟醸香に大きく寄与するとされている酢酸イソアミルを親株の約1.6～1.8倍、またさわやかな酸味を呈するクエン酸又はリンゴ酸を親株よりやや多く生産し、官能的にもバナナ様のフルーティな香りとすっきりした味が強く認められた。

【0023】また、ECO11株は、酢酸イソアミルを親株の1.2～1.3倍生産し、またコハク酸を多く生*

*産しており、官能的にも華やかな香りとさわやかな酸味が認められた。

【0024】実施例2

ミコナゾール及び／又はエコナゾール耐性変異株のうち、MIC17株とECO22株の2株について、表3に示す仕込配合で焼酎の製造を行った。対照株として米焼酎用によく用いられるK-701株を使用した。

【0025】

【表3】

表 3 仕 込 配 合

	初 添	仲 添	留 添	合 計
総 米 (g)	109	198	353	660
掛 米 (g)	80	167	314	561
麴 米 (g)	29	31	39	99
乳 酸 (ml)	0.77			0.77
汲 水 (ml)	204	286	567	1057
酵 母 (ml)	5			5
酵素剤 (mg)	420			420

【0026】掛米は精米歩合70% (w/w) の低品位米を使用した。麴米は、精米歩合72% (w/w) の白米を用いて製造した。酵母は5ml中に 2×10^8 個含むものを添加した。酵素剤はスピターゼM〔ナガセ化学工業(株)製〕を使用した。発酵温度は20℃一定で行った。留後14日目の醪を減圧度-700mmHgで*

* 減圧蒸留し、留出アルコール分20v/v%までの垂口をアルコール25.0v/v%に割水したものを分析した。その結果を表4に示す。

【0027】

【表4】

表 4 米焼酎減圧蒸留液分析結果

	対照株	変 異 株	
	K-701	MIC17	EC022
アルコール (v/v%)	25.0	25.0	25.0
滴定酸度 (ml)	0.30	0.28	0.30
低沸点香気成分 (ppm)			
アセトアルデヒド	71.7	73.4	69.0
酢酸エチル	93.2	95.0	99.8
メタノール	こん跡	こん跡	こん跡
n-プロパノール	128.2	131.3	134.8
酢酸イソアミル	5.8	10.3	11.7
イソブタノール	62.9	84.6	70.0
n-ブタノール	6.6	6.2	5.9
カプロン酸エチル	1.6	1.3	1.5
イソアミルアルコール	346.2	365.0	340.4
官能検査 (芳香性)	2.0	1.7	1.6

【0028】官能検査は3点法(1:良、2:普通、3:悪)で行い、パネラー10名の平均値で表した。

【0029】この結果、MIC17株及びEC022株を用いて製造した米焼酎は、吟醸香である酢酸イソアミル含量が対照のK-701株に比べて多く、官能的にもバナナ様のフルーティな香が強く認められた新しいタイプの焼酎となった。

【0030】以上の結果は、MIC17株、EC011株、及びEC022株が、K-701株にない性質をもつ、すなわち香気エステルを多く生成する新規な酵母菌

であることを示すものである。

【0031】

【発明の効果】本発明による酵母の選択法を用いて得られるミコナゾール及び/又はエコナゾール耐性酵母を使用することにより、高精白米、低温長期仕込の吟醸仕込を行わなくとも、普通酒仕込あるいは低価格米による焼酎仕込において酢酸イソアミルを主とする香気エステルの豊かな、芳香性に富んだ清酒、焼酎及びその他の酒類の製造が、低コストで、しかも短時間で安定して行うことが可能となる。

フロントページの続き

(51) Int. Cl. ⁶

識別記号

片内整理番号

F 1

技術表示箇所

C 1 2 R (1:865)

(72) 発明者 宮部 敏則

滋賀県大津市瀬田 3 丁目 4 番 1 号 寶酒造
株式会社中央研究所内